



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 03 718 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
G 01 N 33/53

②1 Aktenzeichen: 197 03 718.6
②2 Anmeldetag: 22. 1. 97
④3 Offenlegungstag: 24. 7. 97

DE 197 03 718 A 1

⑥6 Innere Priorität:

196 02 341.6 23.01.96

⑦1 Anmelder:

Institut für Chemo- und Biosensorik Münster e.V.,
48149 Münster, DE

⑦4 Vertreter:

PFENNING MEINIG & PARTNER, 10707 Berlin

⑦2 Erfinder:

Key, Göran, Dipl.-Biol. Dr., 49084 Osnabrück, DE;
Kröger, Dietmar, Dipl.-Chem., 48151 Münster, DE

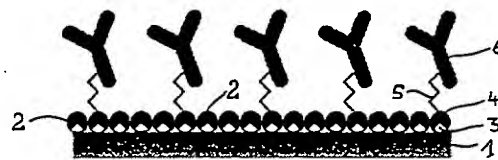
Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Affinitätssensoren und -assays

⑤7 Die Erfindung bezieht sich auf Affinitätssensoren und -assays zur Detektion von Substanzen über spezifische Bindungen zwischen Rezeptoren und Liganden, also auf Rezeptor-Ligand-Systeme.

Derartige Sensoren und Assays werden insbesondere, jedoch nicht ausschließlich, im Bereich der Biosensorik und Biochemie, der Pharmazie, der Pharmazeutik, der Umweltchemie und auch ganz allgemein im Bereich der Chemie verwendet.

Für die erfindungsgemäßen Rezeptor-Ligand-Systeme werden Dendrimere eingesetzt, an deren Oberfläche zu den nachzuweisenden Analyten komplementäre Rezeptoren bzw. Liganden, vorzugsweise kovalent, gebunden sind. Bei zusätzlicher Bindung von Farbstoffen an die Dendrimeroberfläche ist ein sehr einfacher, intensiver und genauer Farbnachweis der Analyten möglich. Die erfindungsgemäßen Dendrimere eignen sich insbesondere zum Einsatz im Bereich der Bioanalytik, Biosensorik und Biochemie.



DE 197 03 718 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 05. 97 702 030/665

11/22

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf Affinitätssensoren und -assays zur Detektion von Substanzen über spezifische Bindungen zwischen Rezeptoren und Liganden, also auf Rezeptor-Ligand-Systeme.

Derartige Sensoren und Assays werden insbesondere jedoch nicht ausschließlich im Bereich der Biosensorik und Biochemie, der Pharmazie, der Pharmazeutik, der Umweltchemie und auch ganz allgemein im Bereich der Chemie verwendet. Im Bereich der Biosensorik und Biochemie werden sie häufig zum Nachweis von Antikörpern oder Proteinen beispielsweise durch Oberflächen-Plasmonen-Resonanz, Immunhistologie, Immunchromatographie oder auch typischerweise bei Dip-Stick-Assays verwendet.

Bekannt sind beispielsweise sogenannte Dip-Stick-Assays, bei denen ein analytspezifischer Antikörper an einen geeigneten Träger (den Stick) gebunden ist, der den Analyten aus der zu testenden Lösung fängt. Ein weiterer analytspezifischer Antikörper, der ein anderes Epitop auf dem Analytmolekül erkennt, wird gleichzeitig hinzugegeben. Der Bereich des Dip-Sticks, in dem der erste Antikörper immobilisiert ist, kann anschließend angefärbt werden und signalisiert somit das Vorhandensein des Analyten in der getesteten Lösung.

In immunchromatographischen Tests konkurrieren in einer Reaktionskammer freier Analyt und an die Festphase gebundener Analyt um die Bindung an spezifische Antikörper. Bei hohen Analytkonzentrationen bleiben viele Antikörper-Farbstoffkonjugate in Lösung und wandern auf einer geeigneten Festphase zu spezifischen anti-Antikörpern, die auf der Festphase kovalent immobilisiert sind. Dadurch entsteht eine farbige Markierung.

Aus dem Stand der Technik (Mayo und Hallock, Journal of Immunological Methods, Band 120 (1989), Seiten 105 bis 114) ist ein Verfahren bekannt, bei dem mit Hilfe von Oberflächen-Plasmonen-Resonanz die Bindungen zwischen einem Liganden und einem Rezeptor nachgewiesen werden kann. Wesentlich ist dabei, daß der Rezeptor bzw. der Ligand an einer Oberfläche, die einen Wellenleiter begrenzt, gebunden ist.

Problematisch bei sämtlichen dieser Verfahren ist, daß die Oberflächen, an die die Rezeptoren bzw. Liganden gebunden sind, auch unspezifische Adsorption von Proteinen zulassen. Daher sind derartige Affinitätsassays in der Anwendung auf Realproben, beispielsweise Proteingemische wie Blut, Serum oder Blutplasma lediglich eingeschränkt verwendbar. Um derartige unspezifische Bindungen zu vermeiden, werden im Stand der Technik Standard-Blockierungsproteine oder stark hydrophile Verbindungen eingesetzt. Beispielsweise wird von den Firmen Pharmacia und Fisons in den jeweiligen kommerziellen Oberflächen Plasmon Resonance Geräten (Biacore/IAsys) das Polysaccharid Dextran als Blockierungsreagenz verwendet. Der Einsatz dieser Verbindung stellt zwar eine deutliche Verbesserung zu früher dar, es ist jedoch dennoch noch nicht möglich, generell in Blut zu messen.

Nach dem Stand der Technik erfolgt der Farbnachweis von Antikörpern mit Goldpartikeln bzw. mit Partikeln aus Kohlenstoff oder SiO_2 (Uchida et al. Journal American Chemical Soc. 1990, Band 112, Seiten 7077 bis 7079). Die Bindung erfolgt dabei über hydrophobe Wechselwirkungen, wodurch stets die Gefahr der unspezifischen Bindungen der Partikel an Oberflächen besteht. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß die Biomoleküle nicht gerichtet gekoppelt werden können, so

daß bei bestimmten Molekülen eine Inaktivierung durch die Bindung an die Partikel nicht auszuschließen ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Affinitätssensoren und -assays, d. h. Nachweisreagenzien bzw. Rezeptor-Ligand-Systeme sowie Verfahren zum spezifischen Nachweis von Analyten, beispielsweise Liganden bzw. Rezeptoren, zur Verfügung zu stellen, die einen Nachweis derartiger Analyte mit hoher Genauigkeit sowie mit geringem störenden Untergrundsignal ermöglichen.

Diese Aufgabe wird durch die Dendrimere gemäß Anspruch 1 sowie durch die Verwendung dieser Dendrimere nach Anspruch 11 in Verbindung mit ihren kennzeichnenden Merkmalen gelöst.

Dendrimere sind dreidimensionale Polymere annähernd kugelförmiger Gestalt. Sie zeichnen sich durch eine festgelegte Zusammensetzung, großes Molekulargewicht sowie durch eine stark verzweigte Architektur aus. Sie werden daher häufig auch nanoskopische Verbindungen genannt. Die Synthese erfolgt nach dem Stand der Technik dabei ausgehend von einem polyvalenten Monomer schichtweise in sogenannten Generationen. Die Herstellung solcher Dendrimere ist ausführlich in Uchida et al. Journal American Chemical Soc. 1990, Band 112, Seiten 7077 bis 7079, beschrieben.

Durch Auswahl der Monomere kann die Größe dieser Moleküle sehr genau festgelegt werden. Der kugelförmige Habitus ergibt sich aus den sterischen Wechselwirkungen der letzten Generation. Durch Wahl der Monomere der letzten Generation kann die Funktionalität der Oberfläche der Dendrimere festgelegt werden. Darüber hinaus können diese Moleküle durch eine sogenannte konvergente Synthese erzeugt werden. Dabei werden zunächst Kugelschnitte synthetisiert, die später miteinander verknüpft werden.

Bei Einsatz von Dendrimeren für die Anbindung spezifischer Rezeptormoleküle bzw. spezifischer Ligandmoleküle kann über die Wahl der Monomere der letzten Generation die Funktionalität der Oberfläche der Dendrimere festgelegt werden. Derartige Dendrimere erlauben die gerichtete Kopplung und spezifische Bindung von Rezeptormoleküle bzw. Ligandenmoleküle und dadurch eine spezifische und sehr intensive Markierung von Ligand- bzw. Rezeptormolekülen. Je nach Analyt (Rezeptor bzw. Ligand) wird an die Oberfläche der Dendrimere das jeweils komplementäre Molekül (Ligand bzw. Rezeptor) gebunden.

Dabei ist der Einsatzbereich dieser Dendrimer-Rezeptor/Ligand-Konjugate nicht nur auf das System Antikörper-Antigen beschränkt sondern kann prinzipiell auf alle Rezeptor-Ligand-Systeme übertragen werden, beispielsweise auf den Nachweis von Proteinen, Ribonukleinsäuren oder Desoxyribonukleinsäuren. Auch an den Nachweis anorganischer Analyte kann gedacht werden, wobei es auch hier möglich ist, ein Dendrimer-Antikörper-Konjugat oder auch ein sonstiger anorganischer spezifischer Ligand für den Analyten in Verbindung mit einem Dendrimer zu verwenden. Die große und regelmäßige Oberfläche ermöglicht es, eine hohe Belegungsdichte mit Rezeptoren bzw. Liganden zu ermöglichen.

Die erfindungsgemäßen Dendrimere werden besonders vorteilhaft in der Bioanalytik, Biosensorik oder Immunodiagnostik eingesetzt.

Vorteilhafte Weiterbildungen der erfindungsgemäßen Dendrimere und ihrer Anwendung werden in den abhängigen Ansprüchen gegeben.

Durch die hohe Zahl an reaktiven Gruppen auf der

Oberfläche der Dendrimere ist es möglich, neben den Rezeptormolekülen bzw. Ligandenmolekülen viele Farbstoffmoleküle pro Dendrimer zu binden. Derartige Farbstoff-Rezeptor/Ligand-Dendrimer-Konjugate können insbesondere vorteilhaft in der Biosensorik, Bioanalytik oder Immundiagnostik eingesetzt werden. Werden als Farbstoffe Fluorophore verwendet, so eignen sich die Dendrimere zum Einsatz bei Fluoreszenz-Immunoassays. Mit Hilfe dieser Konjugate wird bei sämtlichen im Stand der Technik bekannten Immunoassays eine besonders intensive Farbmakierung und damit ein besonders guter Nachweis von Analyten möglich.

Die Dendrimere können mit den Rezeptormolekülen bzw. Ligandenmolekülen über Spacermoleküle oder mit Hilfe von Crosslinker-Molekülen kovalent gebunden werden. Insbesondere ist über derartige kovalente Bindungen eine gerichtete Bindung der Rezeptoren bzw. Liganden möglich. In diesem Falle können die Liganden bzw. Rezeptoren auf den jeweiligen Analyten ausgerichtet werden, wodurch der Nachweis weiter verbessert werden kann. Auch der gleichzeitige Nachweis mehrerer Analyte über den Einsatz einer Mischung von Dendrimern mit unterschiedlichen Rezeptoren/Liganden bzw. über den Einsatz von Dendrimern, an die mehrere unterschiedliche Liganden bzw. Rezeptoren gebunden sind, ist möglich, so daß multifunktionale Nachweismethoden auf einfache Art und Weise durchgeführt werden können.

Der parallele Nachweis mehrerer Analyte wird weiter vereinfacht durch die Bindung unterschiedlicher Farbstoffmoleküle an die Dendrimere, so daß die einzelnen Analyte über unterschiedliche Farbgebungen nachgewiesen werden können.

Anwendung finden mit fluorophorbeladene Dendrimern markierte Antikörper in der Immunhistologie, wo Antigene, die in geringen Konzentrationen im Gewebe exprimiert werden, detektiert werden sollen, was aufgrund der hohen Fluorophordichte pro Antikörpermolekül mit Hilfe der erfindungsgemäßen Dendrimere möglich wird. Ein weiteres Einsatzgebiet sind Fluoreszenz-Immuntests in Mikrotiterplatten und die spezifische Fluoreszenzmarkierung von Oberflächen pro bzw. eukaryontischer Zellen mit Antikörper-Dendrimer-Farbstoffkonjugaten und anschließender Selektion mittels eines fluoreszenzaktivierten Zellsortierers.

In sogenannten Dip-Stick-Assays ist ein analytspezifischer Antikörper an einen geeigneten Träger gebunden, der den Analyten aus der zu testenden Lösung fängt. Ein weiterer analytspezifischer Antikörper, der ein anderes Epitop auf dem Analytmolekül erkennt, und welcher mit chromophorbeladenen Dendrimern gekoppelt ist, wird gleichzeitig hinzugegeben. Durch die hohe Konzentration an Immunkomplexen und die hohe Farbstoffbeladung der Dendrimere färbt sich der Bereich des Dip-Sticks, in dem der erste Antikörper immobilisiert ist, besonders intensiv an und signalisiert somit das Vorhandensein des Analyten in der getesteten Lösung.

In immunchromatographischen Tests konkurrieren in einer Reaktionskammer freier Analyt und an die Festphase gebundener Analyt um die Bindung an spezifische Antikörper. Bei hohen Analytkonzentrationen bleiben viele Antikörper-Dendrimer-Konjugate, die mit Farbstoff markiert sind, in Lösung und wandern auf einer geeigneten Festphase zu spezifischen anti-Antikörpern, die auf der Festphase kovalent immobilisiert sind. Dadurch entsteht eine farbige Markierung. Durch die Kopplung von verschiedenen Farbstoffen an Antikörper-

per-Dendrimer-Konjugate mit unterschiedlichen Spezifitäten ist es möglich, beispielsweise Multianalyt-Teststreifen zu entwickeln, die das Vorhandensein des/der Analyte(n) sowohl durch die Position des gefärbten Bereichs als auch durch die entsprechende Farbe angeben.

Diese Anwendungsbeispiele sind nicht auf das Antigen-Antikörper-System beschränkt, sondern sind prinzipiell auf alle anderen Rezeptor-Ligand-Systeme übertragbar. Beispiele hierfür sind nukleinsäurebindende Proteine, komplementäre Nukleinsäurestränge, Lektine, Rezeptoren für niedermolekulare bzw. hochmolekulare Verbindungen sowie anorganische Substanzen. Eingeschlossen sind auch die nativen Formen dieser Rezeptor- bzw. Bindungsmoleküle als auch deren rekombinante Analoga. Ebenfalls eingeschlossen sind aktive Fragmente dieser Rezeptor- bzw. Bindungsmoleküle, die enzymatisch, chemisch oder rekombinant hergestellt werden.

Besonders vorteilhaft ist, daß die erfindungsgemäßen Dendrimere mit einer hydrophilen Oberfläche ausgestattet werden können, so daß in biologischen Realproben die unspezifische Bindung von Proteinen an die Dendrimer-Rezeptor/Ligand-Konjugate stark verringert wird und der Einsatz von Blockierungssubstanzen reduziert werden oder auch ganz entfallen kann.

Dieser Vorteil wirkt sich insbesondere bei der Beschichtung von Transduktoroberflächen in Biosensoren aus, wobei hier die Transduktoren beispielsweise dielektrische Wellenleiter, planare oder faseroptische Oberflächenplasmonen-Resonanz-Meßwertwandler aber auch Mikrotiterplatten für den Einsatz in ELISAs einschließen.

In diesem Falle werden Transduktoroberflächen mit Dendrimern beschichtet, die eine hydrophile Oberflächen besitzen und an die in Richtung des Probenmediums Rezeptoren bzw. Liganden gebunden sind. Dadurch wird eine hochspezifische und effektive Bindung der Analyten an die Transduktoroberflächen bewirkt und gleichzeitig die unspezifische Bindung von beispielsweise Proteinen an die Transduktoroberfläche stark verringert.

Die Beschichtung der Transduktoren kann mit Standardtechniken durchgeführt werden. Zur Derivatisierung von dielektrischen Wellenleitern wird beispielsweise eine Silanisierung durchgeführt und im Anschluß an diese silanierte Oberfläche aminofunktionalisierte Dendrimere gekoppelt. Diese präparierte Oberfläche kann anschließend mittels homo- oder heterobifunktionaler Crosslinker mit biologisch aktiven Komponenten gerichtet beschichtet werden.

Eine besondere Form der gerichteten Synthese der erfindungsgemäßen Konjugate sind Dendrimere, die über konvergente Synthese aus definierten Sektoren aufgebaut werden. Damit ist es beispielsweise möglich, Dendrimere in der Oberflächenplasmonenresonanz einzusetzen, die über einen thiofunktionalisierten und einen hydroxylfunktionalisierten Sektor verfügen. Diese Dendrimere können zur direkten Transduktorbeschichtung genutzt werden, da die Thiolgruppen eine hohe Affinität zur Edelmetalloberfläche des Transduktors der Oberflächenplasmonenresonanz aufweisen, dort kovalent binden und damit wegen der heterogenen Sektoreierung der Dendrimere der hydrophile Teil zum Probenmedium gerichtet ist. Über den Einsatz heterobifunktionaler Crosslinker lassen sich an diesem hydrophilen Teil Antikörper sowie Farbstoffe für Farbnachweise gerichtet an diese so präparierte Sensoroberfläche koppeln.

Im folgenden werden einige Beispiele für die erfindungsgemäßen Konjugate mit unterschiedlichen Spezifitäten

dungsgemäßen Dendrimere sowie ihre Verwendung gegeben.

Fig. 1 beschreibt eine Transduktoroberfläche, die mit erfindungsgemäßen Dendrimern beschichtet ist.

Beispiel 1

Kopplung von Dendrimern an Antikörper

1 mg Antikörper gelöst in Natriumacetatpuffer, 0,1 M, pH 4,5, mit 40 mM Natriummetaperjodat, wird für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Oxidation der Zuckerseitenketten wird gestoppt durch Zugabe von 100 µl 15 mM Glycerin in H₂O und für 10 min bei RT inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger Reaktanden erfolgt eine Gelfiltration mittels Sephadex G 25. Elutionsmittel: Na-Phosphatpuffer, 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4. NH₂-funktionalisierte Dendrimere (Starburst, Generation 4, Aldrich, Produkt-Nr. 41,244-9) (10 µl einer methanolischen Stocklösung, entspricht $5,7 \times 10^{-8}$ mol) werden durch Bildung Schiff'scher Basen, die durch gleichzeitige Gabe von 1 mg Na-Cyanoborhydrid reduziert werden, an die Aldehydgruppen der oxidierten Kohlenhydratseitenketten der Antikörper gebunden. Die Inkubationszeit beträgt 24 h bei 4°C.

Beispiel 2

Kopplung von Dendrimern an Antikörper

a) Reversible Blockierung der Aminogruppen des Antikörpers

0,5 mg Antikörper in 50 mM Hepes-Puffer, pH 8,5, werden für 1 h bei RT mit 33 µM Citraconic Anhydrid inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger Reaktanden erfolgt eine Gelfiltration mittels Sephadex G 25. Elutionsmittel: Na-Phosphatpuffer, 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4. Die Fraktionen werden spektrophotometrisch bei 280 nm auf den Gehalt an Protein untersucht. Diejenigen Fraktionen, die Antikörper enthalten, werden mittels Ultrafiltration mit z. B. Centrikon-Kartuschen (Amicon), die eine Ausschußgrenze von 30 kDa haben, auf die gewünschte Proteinkonzentration eingeeengt.

b) Irreversible Blockierung der Aminogruppen des Antikörpers

0,5 mg Antikörper in 0,1 M Borax-Puffer, pH 9,0, werden für 1 h bei RT mit 3 µmol Essigsäure-N-Hydroxysuccinimidester inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger Reaktanden erfolgt eine Gelfiltration mittels Sephadex G 25. Elutionsmittel: Na-Phosphatpuffer, 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4. Die Fraktionen werden spektrophotometrisch bei 280 nm auf den Gehalt an Protein untersucht. Diejenigen Fraktionen, die Antikörper enthalten, werden mittels Ultrafiltration mit z. B. Centrikon-Kartuschen (Amicon), die eine Ausschußgrenze von 30 kDa haben, auf die gewünschte Proteinkonzentration eingeeengt.

Die in Schritt a) oder b) erhaltenen NH₂-blockierten Antikörper (0,5 mg/0,5 ml) werden mit 20 mmol 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), 5 mmol N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 10^{-7} mol Dendrimern (Starburst, Generation 4, Aldrich, Produkt-Nr. 41,244-9) in Phosphatpuffer, 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4, für 16 h bei 4°C inkubiert.

Beispiel 3

Kopplung von Dendrimern an Antikörper

1 mg Antikörper in 1 ml Borax-Puffer, 0,1 M, pH 9,0, wird mit 2 µmol des homobifunktionellen Spacermoleküls Ethylenglycol-bis(Bernsteinsäure N-Hydroxysuccinimid) (EGS) für 2 h bei RT inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger Reaktanden erfolgt eine Gelfiltration mittels Sephadex G 25. Elutionsmittel: Borax-Puffer. Die aktivierten Antikörper werden mit $5,7 \times 10^{-8}$ mol Dendrimere (Starburst, Generation 4, Aldrich, Produkt-Nr. 41,244-9) für 16 h bei 4°C inkubiert.

Beispiel 4

Kopplung von Dendrimern an Antikörper

6×10^{-8} mol Carboxyl-funktionalisierte Dendrimere (StarburstTM, Generation 3,5, Aldrich, Katalog-Nr. 41,243-0) werden mit 5×10^{-4} mol EDC und 1,7 µmol NHS in 100 µl Phosphatpuffer, 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4 für 1 h inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger Reaktanden erfolgt eine Gelfiltration mittels einer Bio-Spin-Kartusche (BioRad, Produkt-Nr. 732-6002). Die aktivierten Dendrimere werden zu 0,5 mg Antikörper in 0,5 ml PBS gegeben und für 30 min inkubiert.

Die Trennung der Antikörper-Dendrimer-Konjugate von freien Antikörpern bzw. Dendrimern erfolgt mittels Gelfiltration über SuperdexTM 200 prep grade (Pharmacia), wobei die Probengröße 1% des Säulenvolumens beträgt. Eluiert wird mit 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,0. Der erste spektrophotometrisch bei 280 nm detektierbare Peak enthält das Dendrimer-Antikörper-Konjugat.

Beispiel 5

Kopplung von Farbstoffen an Konjugate aus Antikörpern und aminofunktionalisierten Dendrimern

Zu den Antikörper-Dendrimer-Konjugaten wird das gleiche Volumen einer gesättigten Lösung des aminoreaktiven Farbstoffs, z. B. Procion Red, in Borax-Puffer, 0,1 M, pH 9,0 gegeben und 24 h bei RT inkubiert. Zum Entfernen überschüssigen Farbstoffs erfolgt eine Gelfiltration mittels Sephadex G 25. Elutionsmittel: Na-Phosphatpuffer, 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4. Das Farbstoff-Dendrimer-Antikörper-Konjugat ergibt in der SDS-Gelelektrophorese eine stark rot gefärbte Bande, die gegenüber dem nicht konjugierten Kontrollantikörper zu höheren Molekulargewichten hin verschoben ist.

Beispiel 6

Kopplung von aminoreaktiven Fluorophoren an Konjugate aus Antikörpern und aminofunktionalisierten Dendrimern

Antikörper-Dendrimer-Konjugat (Ausgangsmenge des Antikörpers: 1 mg) wird mit dem gleichen Volumen einer 5 mg/ml Fluoresceinisothiocyanat in Borax-Puffer, 0,1 M, pH 9,0, gemischt und über Nacht bei RT inkubiert. Zum Entfernen überschüssigen Fluorophors erfolgt eine Gelfiltration mittels Sephadex G 25. Elutionsmittel: Na-Phosphatpuffer, 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4.

Im Falle der Verwendung von Antikörpern mit rever-

sibel geblockten Aminogruppen wird der Antikörper mit 5%iger Essigsäure versetzt und für 30 min inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger Reaktanden erfolgt eine Gelfiltration mittels Sephadex G 25. Elutionsmittel: Na-Phosphatpuffer, 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4.

Beispiel 7

Bindung von Farbstoffen mit Aminofunktionen an Konjugate aus Antikörpern und Carboxylfunktionalisierten Dendrimeren

Zu den Antikörper-Dendrimer-Konjugaten, die wie in Beispiel 4 beschrieben, hergestellt werden, wird das gleiche Volumen einer gesättigten Lösung des Farbstoffs, z. B. Direct Yellow 62, in Na-Phosphatpuffer, 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4, gegeben und für 16 h bei RT inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger Reaktanden erfolgt eine Gelfiltration mittels Sephadex G 25. Elutionsmittel: Na-Phosphatpuffer, 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4.

Beispiel 8

Kopplung von Dendrimeren an ELISA-Platten

a) Adsorptive Kopplung

Die Näpfe von ELISA-Platten (Nunc Maxisorp C96, Katalog-Nr. 446612), werden mit 100 µl einer Lösung von NH_2 -funktionalisierten Dendrimeren (Starburst, Generation 4, Aldrich, Produkt-Nr. 41,244-9; $5,7 \times 10^{-5}$ M in 0,1 M Carbonat-Puffer, pH 9,6) für 16 h bei 4°C inkubiert. Nach Spülen mit Na-Phosphatpuffer, 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4 können die gewünschten (Bio-)Moleküle nach Methoden wie ausführlich in Hermanson, G.T. et al., Immobilized affinity ligand techniques, Academic Press, San Diego, 1992 beschrieben, gekoppelt werden.

b) Kovalente Kopplung

Die Näpfe von NH_2 -funktionalisierten ELISA-Platten (Costar, Katalog-Nr. 3390) werden mit 100 µl einer 1 mg/ml Ethylenglycol-bis(Bernsteinsäure N-Hydroxysuccinimid) (EGS) Lösung in Na-Phosphatpuffer, 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4, für 1 h bei RT inkubiert. Bei ELISA-Platten mit aminoreaktiven Oberflächen (Costar, Katalog-Nr. 2505) entfällt dieser Aktivierungsschritt. Nach einem Spülschritt mit Phosphatpuffer erfolgt die Inkubation mit einer Dendrimer-Lösung ($5,7 \times 10^{-5}$ M) in Phosphatpuffer. Nach nochmaligem Spülen können die gewünschten (Bio-)Moleküle nach Methoden wie ausführlich in Hermanson, G.T. et al., Immobilized affinity ligand techniques, Academic Press, San Diego, 1992 beschrieben, gekoppelt werden.

Beispiel 9

Kopplung von Dendrimeren an Glasoberflächen

Die Glasoberfläche wird mit einer Lösung bestehend aus 94% Ethanol, 1% Essigsäure, 4% Wasser und 1% 3-Aminopropyltriethoxysilan für 1 h bei 110°C aktiviert. Es folgt eine Inkubation mit 5% Cyanurchlorid und 5% N,N-Diisopropylamin in Aceton für 1 h bei RT. Nach Spülen mit Aceton erfolgt eine Inkubation mit 1% Dendrimerlösung in DMSO für 3 h bei RT. Nach Spülen mit

DMSO können die gewünschten (Bio-)Moleküle nach Methoden wie ausführlich in Hermanson, G.T. et al., Immobilized affinity ligand techniques, Academic Press, San Diego, 1992, beschrieben, gekoppelt werden.

Beispiel 10

Fig. 1 zeigt eine Edelmetalloberfläche 1 eines biosensorischen Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Transduktors. An diese Edelmetalloberfläche 1 sind Dendrimere 2 durch Chemisorption über Thiolgruppen kovalent gebunden. Diese immobilisierten Dendrimere bestehen aus zwei Sektoren 3 und 4, wobei der Sektor 3 (weiß) die zur Bindung an das Edelmetall nötigen Thiolgruppen aufweist, während der Sektor 4 (schwarz) Hydroxylgruppen aufweist. Durch die kovalente Bindung der Sektoren 3 an die Edelmetalloberfläche 3 sind die Sektoren 4 mit ihren Hydroxylgruppen zum Analyten gerichtet. An diese Sektoren 4 sind über die Hydroxylgruppen und über Spacermoleküle 5 Antikörper 6 gebunden, die für den Analyten spezifisch sind.

Eine besonders geordnete Belegung der Edelmetalloberfläche 1 mit Dendrimeren und eine hohe Antikörperdichte ergibt sich hierbei dadurch, daß zuerst die reinen Dendrimere an die Edelmetalloberfläche gebunden werden und erst anschließend die räumlich sperrigen Spacer und Antikörper an die damit schon richtig orientierten Dendrimere gebunden werden.

Patentansprüche

1. Dendrimere, dadurch gekennzeichnet, daß an ihrer Oberfläche spezifische Rezeptormoleküle und/oder Ligandenmoleküle gebunden sind.
2. Dendrimere nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein Antikörper ist.
3. Dendrimere nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß an ihrer Oberfläche Farbstoffmoleküle gebunden sind.
4. Dendrimere nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Farbstoffmoleküle Fluorophore sind.
5. Dendrimere nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungen zumindest teilweise kovalente Bindungen sind.
6. Dendrimere nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Dendrimere mit den gebundenen Rezeptoren und/oder Liganden und/oder Farbstoffen über Spacermoleküle verbunden sind.
7. Dendrimere nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Rezeptoren und/oder Liganden mithilfe homo- oder heterobifunktionelle Crosslinker an die Dendrimere gebunden sind.
8. Dendrimere nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Dendrimere eine hydrophile Oberfläche besitzen.
9. Dendrimeren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere verschiedenen Rezeptoren und/oder mehrere verschiedene Liganden und/oder mehrere verschiedene Farbstoffmoleküle an die Dendrimere gebunden sind.
10. Dendrimere nach mindestens einem der vorher-

gehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Dendrimere mindestens zwei Sektoren aufweisen, in denen verschiedene Rezeptoren und/oder verschiedene Liganden und/oder verschiedene Farbstoffmoleküle gebunden sind.

11. Verwendung von Dendrimeren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche in der Bioanalytik, Biosensorik oder Immundiagnostik.

12. Verwendung von Dendrimeren nach Anspruch 11 für Fluoreszenz-Immunoassays.

13. Verwendung von Dendrimeren nach Anspruch 12 zum Nachweis von Antigenen, dadurch gekennzeichnet, daß der analytspezifische Antikörper an fluorophorbeladene Dendrimere gebunden und mit der das Antigen zu dem Antikörper enthaltenden Probe in Kontakt gebracht wird und daß anschließend an das Antigen gebundene Antikörper durch Anregung der Fluoreszenz des Fluorophors nachgewiesen werden.

14. Verwendung von Dendrimeren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzphotometer und/oder einem Fluoreszenzmikroskop und/oder mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer nachgewiesen wird.

15. Verwendung von Dendrimeren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß farbstoffbeladene Dendrimere als Nachweisreagens in einem Dip-Stick-Assay oder in der Immunchromatographie verwendet werden.

16. Verwendung von Dendrimeren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß an die Oberflächen, an denen die Bindung des Analyten oder Rezeptors erfolgen soll, die Dendrimere gebunden sind.

17. Verwendung von Dendrimeren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Dendrimere an Oberflächen von Immunoassays, beispielsweise Mikrotiterplatten, gebunden sind.

18. Verwendung von Dendrimeren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Dendrimere an Oberflächen von Transduktoren von Biosensoren gebunden sind.

19. Verwendung von Dendrimeren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Dendrimere an die Oberflächen von dielektrischen Wellenleitern oder planaren oder faseroptischen Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Meßwertwandler gebunden sind.

20. Verwendung von Dendrimeren nach mindestens einem der Ansprüche 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Dendrimere kovalent an die Oberflächen gebunden sind.

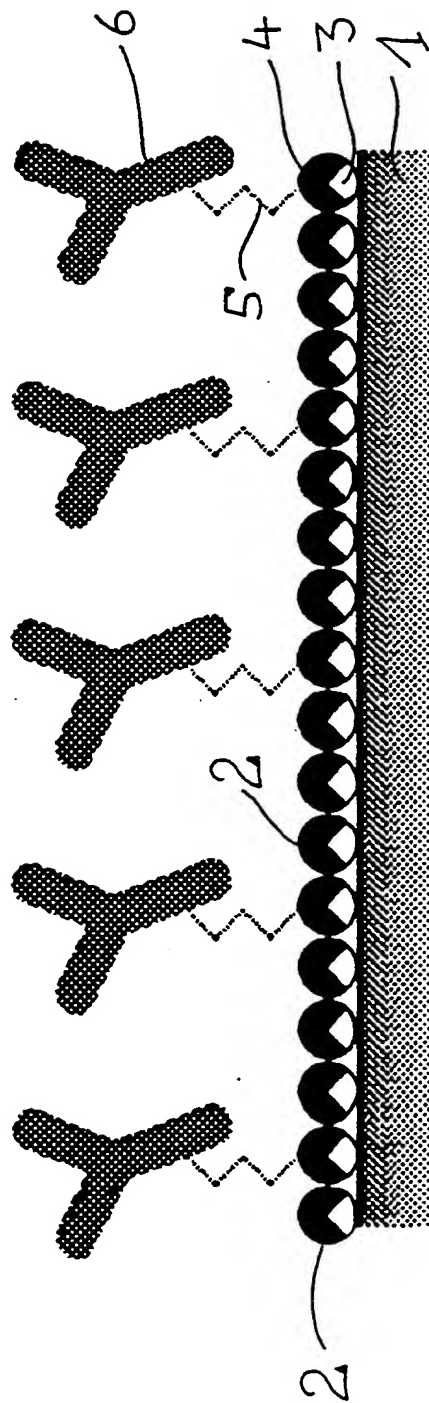
21. Verwendung von Dendrimeren nach mindestens einem der Ansprüche 11 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß Gemische von Dendrimeren mit mehreren verschiedenen Rezeptoren und/oder mehreren verschiedenen Liganden und/oder mehreren verschiedenen Farbstoffmolekülen oder Dendrimere, an die mehrere verschiedene Rezeptoren und/oder mehrere verschiedene Liganden und/oder mehrere verschiedene Farbstoffmoleküle gebunden sind, verwendet werden.

22. Verfahren zur Bindung von Dendrimeren an Oberflächen zur Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 11 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß zuerst unbeladene Dendrimere kovalent an die Oberfläche gebunden werden und an-

schließend die Rezeptoren und/oder Liganden und/oder Farbstoffmoleküle an die Dendrimere kovalent gebunden werden.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



(Fig. 1)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.